



# 論文内容要旨

## 【背景・目的】

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染において、その細胞壁構成成分である lipopolysaccharide (LPS) は重要な病原因子のひとつである。一般に LPS は細胞膜上の Toll-like receptor (TLR)4 に結合し様々な炎症性サイトカインや iNOS 発現を誘導する。しかし、*H. pylori* LPS は TLR2 にも結合して作用を発現する可能性が示唆されており、両者の相互関係や病態生理学的意義については不明な点が多い。TLR は自然免疫応答の鍵となる分子であり、胃粘膜上皮細胞における iNOS 誘導などは *H. pylori* 殺菌・排除システムとして重要であろう。そこで本研究では、*H. pylori* LPS による iNOS 誘導のシグナル伝達系における胃粘膜上皮細胞の TLR2 および TLR4 の病態生理学的意義を明らかにする目的で以下の実験を行った。

## 【方 法】

① マウス正常胃粘膜上皮細胞 (GSM06) を用い *H. pylori* LPS と IFN- $\gamma$  刺激による iNOS, TLR2 および TLR4 の発現・誘導について MAP kinases や NF $\kappa$ B 活性化, これらに対する阻害剤, TLR2 と TLR4 に対する siRNA を用いた検討, ② ヒト生検標本を用いた胃粘膜上皮組織中の TLR2 の発現・誘導についての検討を行った。

## 【結 果】

まず *in vitro* の研究として、マウス正常胃粘膜上皮細胞 (GSM06) を *H. pylori* LPS および Interferon (IFN)- $\gamma$  で刺激することによって検討した。その結果、*H. pylori* LPS および IFN- $\gamma$  刺激により相乗的に iNOS 発現が誘導された。また、TLR2 発現・誘導は相乗的に増強されたが、TLR4 発現は様々な刺激にかかわらず恒常的に認められた。さらに TLR2 の発現・誘導により iNOS 発現の増強が観察された。次に TLR2 発現・誘導機構における mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の役割を明らかにするため、*H. pylori* LPS+IFN- $\gamma$  刺激による各種 MAPK のリン酸化および各種 MAPK 阻害剤による TLR2 mRNA 発現および NF $\kappa$ B 活性に与える影響を検討した。その結果、*H. pylori* LPS および IFN- $\gamma$  刺激による TLR2 発現・誘導は ERK・NF $\kappa$ B が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、TLR2 および TLR4 の役割を明らかにするため、TLR2 および TLR4 の siRNA (small-interfering RNA) による発現抑制が iNOS 活性および TLR2 mRNA/TLR4 mRNA の発現に与える影響を検討した。iNOS 活性は TLR2 または TLR4 を抑制するといずれの場合も抑制されたが、TLR4 の抑制効果は TLR2 の抑制効果よりも強かった。この結果は iNOS 活性に TLR2 および TLR4 が強

く関与していることを示唆している。また、TLR4を抑制するとTLR2発現・誘導は有意に抑制されたが、TLR2を抑制してもTLR4には明らかな影響は認められなかった。次に、*in vivo*の研究としてヒト胃粘膜組織生検標本を用いTLR2に対する免疫組織化学的検討を加えたところ、*H. pylori*感染胃粘膜では非感染胃粘膜に比べて胃粘膜被蓋上皮細胞でTLR2の発現が増強していることを確認した。

### 【結 論】

以上の結果から、*H. pylori* LPS および IFN- $\gamma$  は胃粘膜上皮細胞に対してTLR4を介したERKとNF $\kappa$ B活性化によるシグナル伝達機構によりiNOSならびにTLR2の発現を誘導し、この発現増強したTLR2を介して更にiNOS誘導が増強されている可能性が示唆された。このシステムは、*H. pylori*感染における胃粘膜上皮細胞の自然免疫応答を増強するシステムとして生体防御に大きく寄与するものと考えられた。

## 審査結果の要旨

【背景・目的】 *Helicobacter pylori* 感染において、その細胞壁構成成分 lipopolysaccharide (LPS) は重要な病原因子である。一般に LPS は細胞膜上の TLR4 に結合し炎症性サイトカインを発現誘導するが、*H. pylori* LPS は TLR2 にも結合して作用を発現する可能性が示唆され、両者の相互関係や病態生理学的意義については不明である。TLR は自然免疫応答の鍵となる分子で胃粘膜上皮細胞における iNOS 誘導などは *H. pylori* 殺菌・排除システムとして重要であることが予想される。本研究の目的は *H. pylori* LPS による iNOS 発現誘導機構における胃粘膜上皮細胞の TLR2/TLR4 の病態生理学的意義を明らかにする事である。

【方法】 ① *in vitro* の研究としてマウス胃粘膜上皮細胞 (GSM06) を用い *H. pylori* LPS と IFN- $\gamma$  刺激による iNOS・TLR2・TLR4 の発現誘導について MAPKs や NF $\kappa$ B 活性化、これらに対する阻害剤、TLR2 と TLR4 に対する siRNA を用いた検討を、② *in vivo* の研究としてヒト生検標本を用い胃粘膜上皮組織中の TLR2 の発現誘導についての検討を行った。

【結果】 ① *in vitro* の研究:*H. pylori* LPS +IFN- $\gamma$  刺激により相乗的に iNOS 発現が誘導された。TLR2 発現誘導は相乗的に増強されたが、TLR4 発現は恒常的であった。次に TLR2 発現誘導機構における MAPKs の役割について各種 MAPK のリン酸化および各種 MAPK 阻害剤による TLR2 mRNA 発現および NF $\kappa$ B 活性に与える影響を検討したところ、TLR2 発現誘導に ERK・NF $\kappa$ B が重要な役割を果たしている事が示唆された。さらに TLR2/TLR4 の役割について TLR2/TLR4 の siRNA による発現抑制が iNOS 活性および TLR2 mRNA/TLR4 mRNA の発現に与える影響を検討した。iNOS 活性は TLR2 または TLR4 を抑制するといずれも抑制された。また TLR4 の抑制により TLR2 発現誘導は有意に抑制されたが、TLR2 を抑制しても TLR4 には明らかな影響は認められなかった。② *in vivo* の研究:*H. pylori* 感染胃粘膜では非感染胃粘膜に比べ胃粘膜被蓋上皮細胞で TLR2 の発現が増強している事を確認した。

【結論】 *H. pylori* LPS+IFN- $\gamma$  は胃粘膜上皮細胞に対して TLR4 を介した ERK と NF $\kappa$ B 活性化によるシグナル伝達機構により iNOS ならびに TLR2 の発現を誘導し、この発現増強した TLR2 を介して更に iNOS 誘導が増強されている可能性が示唆された。このシステムは、*H. pylori* 感染における胃粘膜上皮細胞の自然免疫応答を増強するシステムとして生体防御に大きく寄与するものと考えられ、本研究の意義は深いと思われる。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。